

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-191033

(43)公開日 平成7年(1995)7月28日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/544

識別記号

庁内整理番号

A

F I

技術表示箇所

(21)出願番号 特願平5-348553

(22)出願日 平成5年(1993)12月27日

(71)出願人 000233480

日立電子エンジニアリング株式会社  
東京都渋谷区東3丁目16番3号

(72)発明者 根本 亮二

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
立電子エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 春日 里佳

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
立電子エンジニアリング株式会社内

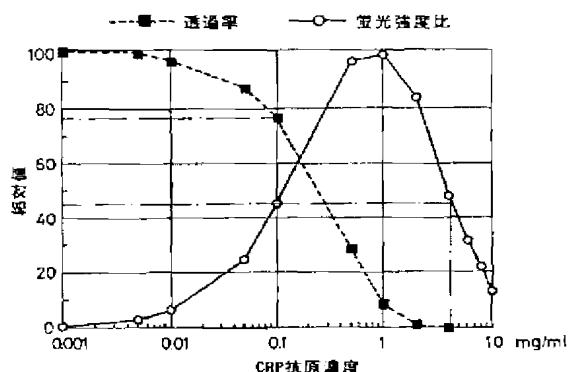
(74)代理人 弁理士 梶山 信是 (外1名)

(54)【発明の名称】 リポソームを用いた免疫測定法

(57)【要約】 (修正有)

【構成】 リポソームを用いた免疫測定法において、既知の濃度のカルボキシフルオレセイン蛍光色素について予め蛍光強度比と透過率との検量線を作成しておき、未知検体についてカルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度比と共に透過率も同時に測定し、得られた両測定値を前記検量線に当てはめることにより、未知検体中のカルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度を決定する。

【効果】 短時間に確実にカルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度を決定することができる。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リボソーム内にカルボキシフルオレセイン蛍光色素を封入し、このリボソーム膜にタンパク抗原または特異抗体を共有結合させてリボソーム膜表面に抗原抗体複合体を形成させ、これに補体を作用させることにより膜攻撃複合体を形成し、該膜攻撃複合体によりリボソーム膜を破壊し、リボソーム内に封入されていたカルボキシフルオレセイン蛍光色素をリボソーム外へ放出させ、この放出されたカルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度を測定することにより抗原量及び抗体量を測定することからなるリボソームを用いた免疫測定法において、カルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度比と共に透過率も同時に測定し、得られた両測定値に基づいてカルボキシフルオレセイン蛍光色素の濃度を決定することを特徴とするリボソームを用いた免疫測定法。

【請求項2】 既知の濃度のカルボキシフルオレセイン蛍光色素について予め蛍光強度比と透過率との検量線を作成しておき、未知検体について測定された蛍光強度比及び透過率の測定値を前記検量線に当てはめることにより、未知検体中のカルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度を決定することからなる請求項1の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はリボソームを用いた免疫測定法に関する。更に詳細には、本発明は蛍光体としてカルボキシフルオレセイン蛍光色素を使用するリボソームを用いた免疫測定法において、短時間に確実にカルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度を決定することができるリボソーム免疫測定法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 抗原抗体反応による免疫測定法は、特異性及び感度の点で非常に優れているので、理化学研究、医学生物学研究及び臨床検査などの諸分野で広く使用されている。この抗原抗体反応を基にして、検体の微量定量を行うために、放射性同位元素によるラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素によるエンザイムイムノアッセイ (EIA)などの方法が開発されてきた。

【0003】 しかし、RIAは感度の点で非常に優れているが、標識物質として放射性同位元素を使用するので、第1種放射線取扱主任者の有資格者が必要であり、測定は特定の放射能管理施設内でなければ実施出来ず、更に、放射性同位元素の廃棄物処理のために特別な施設を必要とするなどの問題点がある。

【0004】 EIAでは標識物質として酵素を用いるため、RIAのような問題は生じないが、未反応の標識物質を分離しなければならないなどの問題点があり、測定には非常に手間がかかる。

【0005】 これらの方法の他に、最近、リボソームを使用する免疫測定法 (LILA) が提案された。このLILAは従来のRIAやEIAと異なり、未反応標識物

2

質の分離操作を必要としない均一系で、しかも、迅速に測定できるなどの利点がある。

【0006】 リボソームは、同一分子内に親水基と疎水基の両方を有する両親媒性の複合脂質（例えば、レシチン、コレステロール、ホスファチジン酸など）を一定の温度以上で緩衝液に懸濁することで調製される脂質二重層からなる小胞体である。このリボソーム膜に、二官能性架橋剤を用いてタンパク抗原又は特異抗体を共有結合する。リボソーム内に蛍光標識としてカルボキシフルオレセイン (CF) を封入する。CFはフルオレセイン系の色素で、水溶性が高く、容易にリボソーム内に封入される。これに特異抗体又は抗原を反応させると、リボソーム膜表面に抗原抗体複合体が形成される。この時、補体が存在すると、補体が活性化され、膜攻撃複合体が形成される。それがリボソーム膜に結合して脂質二重層の透過性が上昇し、リボソーム内のCFが外部溶媒中に流出していく。CFは高濃度でリボソーム内に封入されている時は自己消光により蛍光を発しないが、リボソーム外に流出して外部溶媒に希釈されると蛍光を発するようになる。この蛍光強度を測定することにより抗原量及び抗体量を求めることができる。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 図3に示されるように、CFはモル濃度の増加に従い、或る濃度 ( $C_p$ ) までは蛍光強度と濃度が比例関係を保つが、 $C_p$  を超える比較的高濃度の領域では、逆に蛍光濃度が低下する特性を示す。従って、蛍光強度  $I$  におけるCFの濃度は  $C_1$  と  $C_2$  の二種類の値が得られ、何方の濃度が正しいのか決定できなくなってしまう。

【0008】 このため、従来は、CFの蛍光強度から濃度を推定する検査方法において、CFの濃度領域を限定するか、若しくは、測定対象を幾通りかに希釈して、前後の特性から濃度を推定するなどの迂遠で冗長な方法が採られていた。

【0009】 従って、本発明の目的は、従来のような迂遠な方法を採ることなく、CFの濃度を短時間に確実に推定できる新規な蛍光検出方法を提供することである。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】 前記課題を解決するため、本発明は、リボソーム内にカルボキシフルオレセイン蛍光色素を封入し、このリボソーム膜にタンパク抗原または特異抗体を共有結合させてリボソーム膜表面に抗原抗体複合体を形成させ、これに補体を作用させることにより膜攻撃複合体を形成し、該膜攻撃複合体によりリボソーム膜を破壊し、リボソーム内に封入されていたカルボキシフルオレセイン蛍光色素をリボソーム外へ放出させ、この放出されたカルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度を測定することにより抗原量及び抗体量を測定することからなるリボソームを用いた免疫測定法において、カルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度

比と共に透過率も同時に測定し、得られた両測定値に基づいてカルボキシフルオレセイン蛍光色素の濃度を決定することを特徴とするリボソームを用いた免疫測定法を提供する。

## 【0011】

【作用】前記のように、本発明の方法によれば、カルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度比と共に透過率も同時に測定する。カルボキシフルオレセイン蛍光色素の透過率は濃度に反比例する。すなわち、カルボキシフルオレセイン蛍光色素の濃度の増大につれて透過率は低下する。従って、既知のカルボキシフルオレセイン蛍光色素の濃度について蛍光強度比及び透過率の検量線を作成しておくことにより、得られた未知検体のカルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度比及び透過率測定値を検量線に当てはめることにより検体内的カルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度を短時間に確実に決定することができる。

【0012】このようにして、カルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度が短時間に確実に決定されるので、結果的に、抗原量及び抗体量も短時間に確実に推定することができ、臨床検査ばかりか様々な理化学基礎研究の推進にも大いに役立つことができる。

【0013】なお、この明細書で使用される“蛍光強度比”という用語は、リボソームに封入されている全C.F量に対する蛍光強度を意味する。また、“透過率”という用語は、照射光量に対するセル内の物質によって散乱されずに透過した光量の比率を意味する。

## 【0014】

【実施例】以下、図面を参照しながら本発明を更に詳細に説明する。

【0015】リボソームを用いた免疫測定法自体は公知である。例えば、“製薬工場”, Vol. 7, No. 5 (1987) 421頁～425頁, “生体の科学”, Vol. 38, No. 5 (1987年10月) 498頁～500頁及び“臨床検査”, Vol. 1, 34, No. 7 (1990年7月) 868頁～871頁に詳細に説明されている。

【0016】図1は本発明の方法を実施するのに使用できる光学測定系の一例の概要斜視図である。図示されているように、光源には波長488nmのアルゴンレーザー10を使用する。光源にはフラッシュキセノンなども使用できる。アルゴンレーザー10から出たビームはビームエクスパンダーを通り、NDフィルタ14からアバーチャ16を経て、検体の注入された石英製のセルキュベット18に入射される。このセル18を挟んで、光源と直線的位置関係に透過率測定手段を配置し、光源と直交するように蛍光強度測定手段を配置する。透過率測定手段は例えば、フィルタ(λ=488nmバンドパスフィルタ)20と出力モニタ22とから構成されている。一方、セル18の検体中のカルボキシフルオレセイン蛍光

10

20

色素(C.F)から発せられた蛍光はビンホール30を通り、コンデンサ(集光器)32, 32により集光され、フィルタ(λ=514nm)34で蛍光成分以外の光を除去し、波長514nmの蛍光を集光レンズ36で集め、フィールドトップ38を通してホトセンサ40に入射させる。また、レーザ励起光の出力の変動は、蛍光強度比及び透過率の測定値にも影響する。このため、セル18に入射される直前の励起光出力を測定するためのモニタ23とこのモニタに励起光を入射させるためのハーフミラー24が設けられている。このモニタ23で検出された励起光強度を基準にする。このような構成の光学系を使用することにより検体の透過率と蛍光強度を同時に測定することができる。得られた蛍光強度の測定値を蛍光強度比の形に変換するには、リボソームを界面活性剤により破壊して得られた蛍光強度を100%とし、リボソーム自身の蛍光強度を0%として各測定値を変換すればよい。

【0017】図2は図1に示された光学測定系を用いて作成された抗原濃度(mg/ml)に対する蛍光強度比と488nmの透過率の関係を示す標準検量線である。補体依存性膜損傷反応を利用する免疫測定法には、リリース法、競合法及びサンドイッチ法の3種類があるが、本発明の検量線はサンドイッチ法を用いて作成されている。サンドイッチ法とは、抗原をリボソーム表面中の抗体と、フリーの抗体(二次抗体)でサンドイッチ状態にし、補体を活性化することからなる。

【0018】以下にサンドイッチ法における検量線作成の実例として、血清中に含まれ、炎症時にその含有量が増加することが知られているC-反応性タンパク質(以下「C.R.P」という)を対象とした検量線の作成方法を示す。使用するリボソームは材質としてコレステロール、ジバルミトイロフォスファチジルコリンなど数種のリン脂質を混合して用いる。これにC.Fを封入して多重層リボソームを調製する。一次抗体は、抗ヒトC.R.Pマウスモノクローナル抗体を用い、結合基を作るために過ヨウ素酸で処理し、リボソームと結合させる。この一次抗体が結合したリボソームは、反応を安定させる為の吸収剤を添加した10ミリモルのTES緩衝液を用いて適当な濃度に希釈し、これをリボソーム試薬とする。また、この緩衝液はリボソームの自然崩壊を防ぐ機能も有している。検量線を作成するための各定点に用いる蛍光強度測定用の標準血清は、精製C.R.P抗原を各定点の濃度になるように、上記緩衝液を用いて数段階に希釈したもの用いる。上記のものを準備した上で、検量線の求め方は、以下の要領により行う。リボソーム試薬を上記標準血清を一定量ずつ混合し、ヒト体温に近い37°Cで1時間反応させた。この混合液に二次抗体(例えば、抗ヒトC.R.Pウサギ抗体)溶液と、補体(例えば、モルモット血清)溶液を一定量添加し、更に1時間反応させて反応が安定化した後、各混合液の蛍光強度と透過率を測

30

40

50

50

定し、図2に示されるような検量線を作成する。

【0019】例えば、検体の透過率の測定値が7.8%で蛍光強度比が4.5%の場合、図2より、検体内のCRP濃度は0.1mg/mlであると決定できる。従来のように蛍光強度比だけからCRP濃度を決定する場合、蛍光強度比が4.5%に対応するCRP濃度は0.1mg/mlの他に4mg/mlの両方が得られ、何れが正しい濃度なのか即座には決定できない。透過率の曲線はCRP濃度の増大につれて指数関数的に減衰するので、所定の透過率に対応するCRP濃度の交点は一つしかない。従って、仮に検体の透過率の測定値と蛍光強度比の測定値に対応するCRP濃度が完全に一致しなくとも、透過率の測定値に対応するCRP濃度に最も近い、蛍光強度比の測定値に対応するCRP濃度をもって検体のCRP濃度であると決定することもできる。

【0020】このように、検体の透過率の測定値を同時に測定することにより、この透過率測定値に基づき、蛍光強度比測定値に対応する真正な抗原濃度を短時間に確実に決定することができる。従って、従来のCFの蛍光強度から濃度を推定する測定方法におけるような、濃度領域を限定したり、あるいは、測定対象を幾通りかに希釈して前後の特性から濃度推定を行う迂遠で冗長な操作は全て不要になる。

【0021】以下、具体例により本発明の方法の実効性を例証する。

#### 【0022】実施例

抗体依存性膜損傷反応を利用した抗体測定の具体例について説明する。試薬及び方法は前記と同様な試薬と方法を使用した。検体としては、病院より供与されたCRP陽性血清について、吸収剤添加10ミリモルTES緩衝液により100倍に希釈したものを検体として、その蛍光強度を測定することにより各検体中のCRP濃度を得た。従来から使用され、信頼性の高い抗原抗体反応時の沈降反応や凝集反応を光学的IC検出するTIA法によっても上記と同じ検体のCRP測定を行い、両方法の相関を調べた。その結果、図4に示すような相関が得られ、相関係数も0.98と良好で、本方法の信頼性が確認された。

#### 【0023】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の方法によれば、カルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度比と共に透過率も同時に測定する。既知のカルボキシフルオレセイン蛍光色素の濃度について蛍光強度比及び透過

率の検量線を作成しておくことにより、得られた未知検体のカルボキシフルオレセイン蛍光色素の蛍光強度比及び透過率測定値を検量線に当てはめることにより検体内のカルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度を短時間に確実に決定することができる。このようにして、カルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度が短時間に確実に決定されるので、結果的に、抗原量及び抗体量も短時間に確実に推定することができ、臨床検査ばかりか様々な理化学基礎研究の推進にも大いに役立つことができる。

【0024】このように、蛍光強度比と共に検体の透過率を同時に測定することにより、この透過率測定値に基づき、蛍光強度比測定値に対応する真正なCF濃度を短時間に確実に決定することができる。従って、従来のCFの蛍光強度から濃度を推定する測定方法におけるような、濃度領域を限定したり、あるいは、測定対象を幾通りかに希釈して前後の特性から濃度推定を行う迂遠で冗長な操作は全て不要になる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の方法を実施するのに使用できる光学測定系の一例の概要斜視図である。

【図2】図1の装置を用いて作成された蛍光強度比と透過率との検量線を示す線図である。

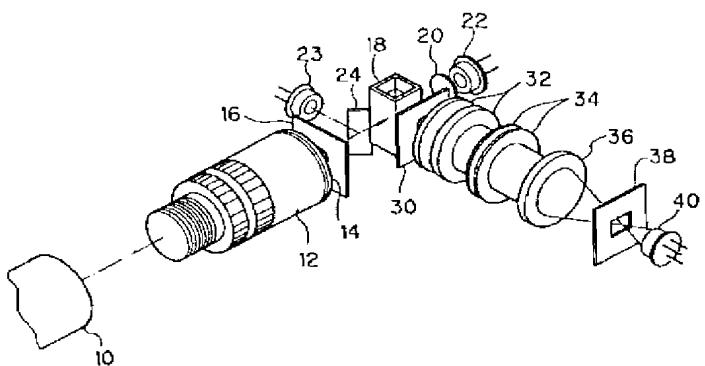
【図3】カルボキシフルオレセイン蛍光色素濃度と出力電圧値に換算した蛍光強度の関係を示す特性曲線の線図である。

【図4】本発明の方法により得られたCRP濃度測定値と従来のTIA法により得られたCRP濃度測定値の相関関係を示す特性図である。

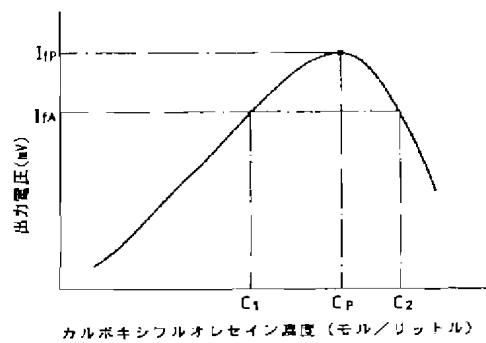
#### 【符号の説明】

30	10	光源
	12	ビームエクスパンダー
	14	NDフィルタ
	16	アバーチャ
	18	セル
	20	フィルタ
	22	出力モニタ
	30	ピンホール
	32	コンデンサ
	34	フィルタ
40	36	集光レンズ
	38	フィールドストップ
	40	ホトセンサ

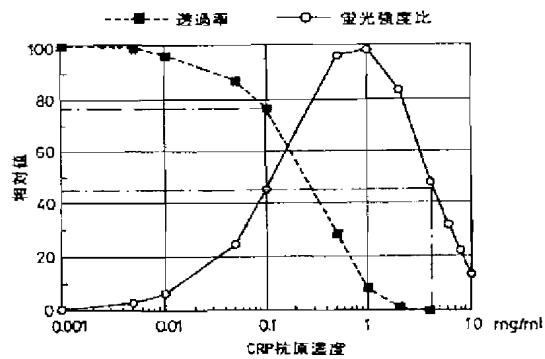
【図1】



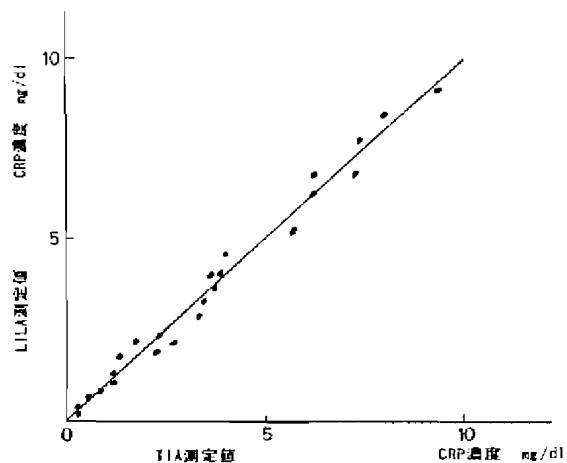
【図3】



【図2】



【図4】



# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-191033

(43)Date of publication of application : 28.07.1995

(51)Int.CI.

G01N 33/544

(21)Application number : 05-348553

(71)Applicant : HITACHI ELECTRON ENG CO LTD

(22)Date of filing : 27.12.1993

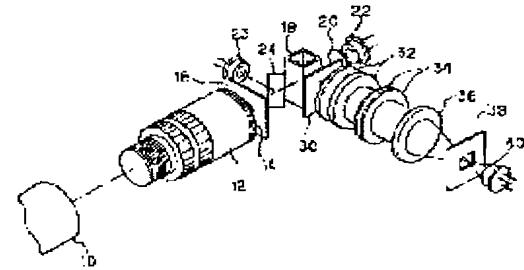
(72)Inventor : NEMOTO RYOJI  
KASUGA RIKA

## (54) IMMUNOASSAY METHOD USING LIPOSOME

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To surely estimate the concentration of carboxyfluorescein (CF) in a short time by simultaneously measuring the fluorescence intensity ratio and transmittance of a CF fluorescent pigment and deciding the concentration of the pigment based on both measured values.

**CONSTITUTION:** An argon laser 10 is used as a light source and a laser beam from the laser 10 is made incident on a cell cuvet 18 containing an injected specimen through an ND filter 14 and aperture 16. A transmittance measuring means is positioned on the opposite side of the light source with respect to the cell 18 in a linear positional relation and a fluorescence intensity measuring means is positioned in a perpendicular positional relation with respect to the light source section. The fluorescence from a CF fluorescent pigment contained in the specimen is condensed by means of a condenser 32 through a pinhole 30 and made incident on a photosensor 40 after the light other than a fluorescent component is removed through a filter 34. The fluorescence of the pigment is measured on the basis of the intensity of excited light intensity detected by means of a monitor 23. When such an optical system constitution is used, the transmittance and fluorescence intensity of the specimen can be measured simultaneously. The conversion of the fluorescence intensity measured value into the fluorescence intensity ratio is performed by using the intensity of liposome destroyed by a surface-active agent and the intensity of the liposome itself.



### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

## [Claim(s)]

[Claim 1] Enclose a carboxy fluorescein fluorochrome in liposome, carry out covalent bond of a protein antigen or the specific antibody to this liposome film, and an antigen antibody complex is made to form in a liposome film front face. By making complement act on this, form film attack complex and the liposome film is destroyed with this film attack complex. The carboxy fluorescein fluorochrome enclosed in liposome is made to emit out of liposome. In the immunoassay using the liposome which consists of measuring the amount of antigens, and the amount of antibodies by measuring the fluorescence intensity of this emitted carboxy fluorescein fluorochrome Immunoassay using the liposome characterized by also measuring transmission to coincidence and determining the concentration of a carboxy fluorescein fluorochrome based on both the obtained measured value with the fluorescence intensity ratio of a carboxy fluorescein fluorochrome.

[Claim 2] The approach of claim 1 which consists of determining the carboxy fluorescein fluorochrome concentration in a strange specimen by creating the calibration curve of a fluorescence intensity ratio and permeability beforehand about the carboxy fluorescein fluorochrome of known concentration, and applying the measured value of the fluorescence intensity ratio measured about the strange specimen, and permeability to said calibration curve.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

## [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the immunoassay which used liposome. Furthermore, this invention relates to the liposome immunoassay which can determine carboxy fluorescein fluorochrome concentration in a short time certainly at a detail in the immunoassay using the liposome which uses a carboxy fluorescein fluorochrome as a fluorescent substance.

[0002]

[Description of the Prior Art] Since the immunoassay by the antigen-antibody reaction is very excellent in respect of singularity and sensibility, it is widely used in many fields, such as physicochemistry research, medicine biology research, and a clinical laboratory test. In order to perform the microestimation of a specimen based on this antigen-antibody reaction, approaches, such as radioimmunoassay (RIA) by radioisotope and enzyme immunoassay (EIA) by the enzyme, have been developed.

[0003] However, although RIA is very excellent in respect of sensibility, since radioisotope is used as a marker, qualified person of the 1st sort person in charge of handling radiation is required, and if measurement is not in specific activity maintenance facilities, it cannot be carried out, but has troubles, such as needing the still more nearly special facility for the waste treatment of radioisotope.

[0004] Although a problem like RIA is not produced in EIA in order to use an enzyme as a marker, there is a trouble of having to separate an unreacted marker and measurement takes time and effort very much.

[0005] The immunoassay (LILA) which uses the liposome other than these approaches was proposed recently. Unlike conventional RIA or EIA, this LILA is the homogeneous system which does not need separation actuation of an unreacted marker, and has the advantage of being able to measure quickly moreover.

[0006] Liposome is an endoplasmic reticulum which consists of a lipid bilayer prepared by suspending the amphiphilic conjugated lipid (for example, lecithin, cholesterol, phosphatidic acid, etc.) which has both a hydrophilic group and a hydrophobic group in the same intramolecular in the buffer solution above fixed temperature. A bifunctional cross linking agent is used for this liposome film, and covalent bond of a protein antigen or the specific antibody is carried out to it. A carboxy fluorescein (CF) is enclosed as fluorescent labeling in liposome. CF is coloring matter of a fluorescein system, and water solubility is high and is easily enclosed in liposome. If a specific antibody or an antigen is made to react to this, an antigen antibody complex will be formed in a liposome film front face. If complement exists at this time, complement will be activated and film attack complex will be formed. It binds to the liposome film, the permeability of a lipid bilayer rises, and CF in liposome flows out into an external solvent. CF does not emit fluorescence by the self-quenching, when enclosed in liposome by high concentration, but if it flows out out of liposome and an external solvent dilutes, it will come to emit fluorescence. The amount of antigens and the amount of antibodies can be calculated by measuring this fluorescence intensity.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It is CP, although, as for CF, fluorescence intensity and concentration maintain proportionality to a certain concentration (CP) according to the increment in mol concentration as shown in drawing 3. The comparatively high-concentration field which exceeds shows the property that fluorescence concentration falls conversely.

Therefore, the concentration of CF in fluorescence intensity IfA is C1. C2 Two kinds of values are acquired and it will become impossible to determine the concentration of what one in that of the right.

[0008] For this reason, whether the concentration field of CF being conventionally limited in the inspection approach of presuming concentration, from the fluorescence intensity of CF, and the measuring object were diluted to several kinds, and the roundabout and redundant approach of presuming concentration from the property of order was taken.

[0009] Therefore, the purpose of this invention is offering the new fluorescence detection approach the concentration of CF being presumed certainly in a short time, without taking a roundabout approach like before.

[0010]

[Means for Solving the Problem] In order to solve said technical problem, this invention encloses a carboxy fluorescein fluorochrome in liposome. Carry out covalent bond of a protein antigen or the specific antibody to this liposome film, and an antigen antibody complex is made to form in a liposome film front face. By making complement act on this, form film attack complex and the liposome film is destroyed with this film attack complex. The carboxy fluorescein fluorochrome enclosed in liposome is made to emit out of liposome. In the immunoassay using the liposome which consists of measuring the amount of antigens, and the amount of antibodies by measuring the fluorescence intensity of this emitted carboxy fluorescein fluorochrome. The immunoassay using the liposome characterized by also measuring transmission to coincidence and determining the concentration of a carboxy fluorescein fluorochrome based on both the obtained measured value with the fluorescence intensity ratio of a carboxy fluorescein fluorochrome is offered.

[0011]

[Function] As mentioned above, according to the approach of this invention, permeability is also measured to coincidence with the fluorescence intensity ratio of a carboxy fluorescein fluorochrome. The permeability of a carboxy fluorescein fluorochrome is in inverse proportion to concentration. That is, permeability falls along with increase of the concentration of a carboxy fluorescein fluorochrome. Therefore, the carboxy fluorescein fluorochrome concentration in a specimen can be certainly determined in a short time by applying the fluorescence intensity ratio and transmissometry value of a carboxy fluorescein fluorochrome of a strange specimen which were acquired to a calibration curve by creating the calibration curve of a fluorescence intensity ratio and transmission about the concentration of a known carboxy fluorescein fluorochrome.

[0012] Thus, since carboxy fluorescein fluorochrome concentration is determined for a short time certainly, as a result, the amount of antigens and the amount of antibodies can also be presumed certainly in a short time, and can greatly be useful also to promotion of clinical laboratory tests or various physicochemistry fundamental researches.

[0013] In addition, the vocabulary the "fluorescence intensity ratio" used on these specifications means the fluorescence intensity to the total amount of CF enclosed with liposome. Moreover, the vocabulary "permeability" means the ratio of the quantity of light penetrated without being scattered about with the matter in the cel to the exposure quantity of light.

[0014]

[Example] Hereafter, this invention is further explained to a detail, referring to a drawing.

[0015] The immunoassay using liposome itself is well-known. For example, it is explained to a "pharmaceutical factory", Vol.7, No.5 (1987) 421 page -425 page, "a living body's science", Vol.38, No.5 (October, 1987) 498 page -500 page and a "clinical laboratory test", Vol.34, and No.7 (July, 1990) 868 page -871 page at the detail.

[0016] Drawing 1 is the outline perspective view of an example of the optical measurement system which can be used for enforcing the approach of this invention. The argon laser 10 with a wavelength of 488nm is used for the light source as illustrated. A flash plate xenon etc. can be used for the light source. The beam which came out of argon laser 10 passes along a beam

expander, and incidence is carried out to the cel cuvette 18 made from a quartz into which the specimen was poured through aperture 16 from ND filter 14. This cel 18 is pinched, a transmissometry means is arranged to the light source and linear physical relationship, and a fluorescence intensity measurement means is arranged so that it may intersect perpendicularly with the light source. The transmissometry means consists of a filter (lambda= 488nm band pass filter) 20 and an output monitor 22. On the other hand, it passes along a pinhole 30, and is condensed by capacitors (substage condenser) 32 and 32, and the fluorescence emitted from the carboxy fluorescein fluorochrome in the specimen of a cel 18 (CF) removes light other than a fluorescence component with a filter (lambda= 514nm) 34, collects fluorescence with a wavelength of 514nm with a condenser lens 36, and it is made it to carry out incidence to the phot sensor 40 through the field stop 38. Moreover, fluctuation of the output of laser excitation light also influences the measured value of a fluorescence intensity ratio and permeability. For this reason, the half mirror 24 for carrying out incidence of the excitation light to the monitor 23 and this monitor for measuring an excitation optical output just before incidence is carried out to a cel 18 is formed. It is based on the excitation light reinforcement detected with this monitor 23. The permeability and fluorescence intensity of a specimen can be measured to coincidence by using the optical system of such a configuration. What is necessary is just to change each measured value, making into 100% fluorescence intensity which destroyed liposome with the surfactant and was obtained, and using own fluorescence intensity of liposome as 0%, in order to change the measured value of the obtained fluorescence intensity into the form of a fluorescence intensity ratio.

[0017] Drawing 2 is a standard calibration curve which shows relation with a fluorescence intensity ratio [ to the antigen concentration (mg/ml) created using the optical measurement system shown in drawing 1 ], and a permeability of 488nm. Although there are three kinds of immunoassay using a complement dependency film damage reaction, the releasing method, the competing method, and a sandwich technique, the calibration curve of this invention is created using the sandwich technique. An antigen is changed into a sandwiches condition by the antibody in a liposome front face, and the free antibody (second antibody), and it becomes a sandwich technique from activating complement.

[0018] The creation approach of the calibration curve for C-reactivity protein (henceforth "CRP") with which it is known that it will be contained in a blood serum as an example of the calibration-curve creation in a sandwich technique below, and the content will increase below at the time of inflammation is shown. The liposome to be used mixes and uses several sorts of phospholipid, such as cholesterol and dipalmitoyl phosphatidylcholine, as the quality of the material. CF is enclosed with this and multiplex layer liposome is prepared. Using an anti-Homo sapiens CRP mouse monoclonal antibody, a primary antibody is processed with periodic acid, in order to make a joint radical, and it is combined with liposome. The liposome which this primary antibody combined is diluted to suitable concentration using the TES buffer solution of 10 millimols which added the absorbent for stabilizing a reaction, and makes this a liposome reagent. Moreover, this buffer solution also has the function which prevents the spontaneous disintegration of liposome. in order to create a calibration curve -- each -- the reference serum for fluorescence intensity measurement used for the fixed point -- a purification CRP antigen -- each -- what was diluted to several steps using the above-mentioned buffer solution is used so that it may become the concentration of the fixed point. The following points perform how to search for a calibration curve, after preparing the above-mentioned thing. The above-mentioned reference serum was mixed the constant rate every, and the liposome reagent was made to react at 37 degrees C near Homo sapiens temperature for 1 hour. After carrying out constant-rate addition, making a second antibody (for example, anti-Homo sapiens CRP rabbit antibody) solution and a complement (for example, guinea pig serum) solution react to this mixed liquor for further 1 hour and a reaction's being stable, the fluorescence intensity and the permeability of each mixed liquor are measured, and a calibration curve as shown in drawing 2 is created.

[0019] For example, when the measured value of the permeability of a specimen is [ a fluorescence intensity ratio ] 45% at 78%, it can be determined from drawing 2 that the CRP concentration in a specimen is 0.1mg/ml. When determining CRP concentration only from a

fluorescence intensity ratio like before, 4mg [/ml] both are obtained by 0.1mg [/ml] others, and the CRP concentration corresponding to 45% in a fluorescence intensity ratio cannot determine immediately any are right concentration. Since the curve of permeability is exponentially decreased along with increase of CRP concentration, there is only one intersection of the CRP concentration corresponding to predetermined permeability. Therefore, even if the CRP concentration corresponding to the measured value of the permeability of a specimen and the measured value of a fluorescence intensity ratio is not completely in agreement, it can also determine to be the CRP concentration of a specimen with the CRP concentration corresponding to the measured value of a fluorescence intensity ratio nearest to the CRP concentration corresponding to the measured value of permeability.

[0020] Thus, based on this transmissometry value, the Shinsei antigen concentration corresponding to fluorescence intensity ratio measured value can be certainly determined in a short time by measuring the measured value of the permeability of a specimen to coincidence. Therefore, a concentration field [ as / in the measuring method which presumes concentration from the fluorescence intensity of conventional CF ] is limited, or all roundabout and redundant actuation of diluting the measuring object to several kinds and performing concentration presumption from the property of order becomes needlessness.

[0021] Hereafter, an example illustrates the effectiveness of the approach of this invention.

[0022] The example of antibody measurement in which the example complement dependency film damage reaction was used is explained. The reagent and the approach used the same reagent and same approach as the above. As a specimen, the CRP concentration in each specimen was obtained by measuring the fluorescence intensity about the CRP positivity blood serum supplied by the hospital by making into a specimen what was diluted 100 times with the absorbent addition 10 millimol TES buffer solution. TIA which is used from the former and detects optically the precipitation and agglutination reaction at the time of a reliable antigen-antibody reaction -- law -- CRP measurement of the same specimen as the above -- carrying out -- both -- correlation of a method was investigated. Consequently, correlation as shown in drawing 4 was acquired, the number of correlators was also as good as 0.98, and the dependability of this approach was checked.

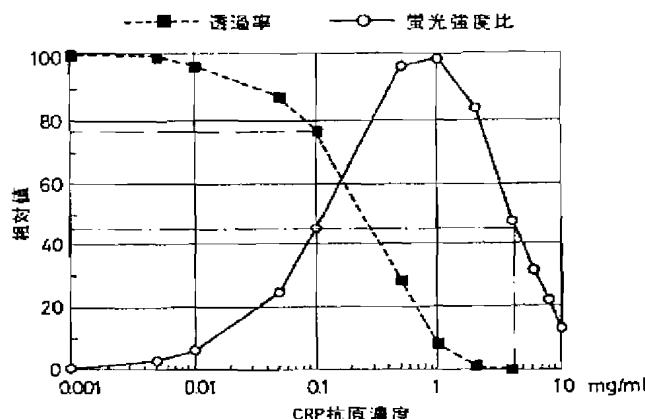
[0023]

[Effect of the Invention] As explained above, according to the approach of this invention, permeability is also measured to coincidence with the fluorescence intensity ratio of a carboxy fluorescein fluorochrome. By creating the calibration curve of a fluorescence intensity ratio and transmission about the concentration of a known carboxy fluorescein fluorochrome, the carboxy fluorescein fluorochrome concentration in a specimen can be certainly determined in a short time by applying the fluorescence intensity ratio and transmissometry value of a carboxy fluorescein fluorochrome of a strange specimen which were acquired to a calibration curve. Thus, since carboxy fluorescein fluorochrome concentration is determined for a short time certainly, as a result, the amount of antigens and the amount of antibodies can also be presumed certainly in a short time, and can greatly be useful also to promotion of clinical laboratory tests or various physicochemistry fundamental researches.

[0024] Thus, based on this transmissometry value, Shinsei CF concentration corresponding to fluorescence intensity ratio measured value can be certainly determined in a short time by measuring the permeability of a specimen to coincidence with a fluorescence intensity ratio. Therefore, a concentration field [ as / in the measuring method which presumes concentration from the fluorescence intensity of conventional CF ] is limited, or all roundabout and redundant actuation of diluting the measuring object to several kinds and performing concentration presumption from the property of order becomes needlessness.

---

[Translation done.]

Drawing selection Representative drawing ▾

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

### [Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the outline perspective view of an example of the optical measurement system which can be used for enforcing the approach of this invention.

[Drawing 2] It is the diagram showing the calibration curve of the fluorescence intensity ratio and permeability which were created using the equipment of drawing 1.

[Drawing 3] It is the diagram of a characteristic curve showing the relation between carboxy fluorescein fluorochrome concentration and the fluorescence intensity converted into the output voltage value.

[Drawing 4] the CRP density measurement value acquired by the approach of this invention, and conventional TIA -- it is the property Fig. showing the correlation of the CRP density measurement value acquired by law.

### [Description of Notations]

- 10 Light Source
- 12 Beam Expander
- 14 ND Filter
- 16 Aperture
- 18 Cel
- 20 Filter
- 22 Output Monitor
- 30 Pinhole
- 32 Capacitor
- 34 Filter
- 36 Condenser Lens
- 38 Field Stop
- 40 Phot Sensor

---

[Translation done.]

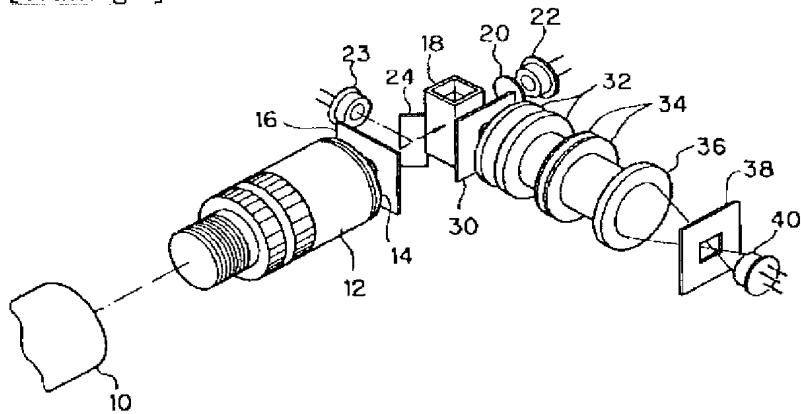
## \* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

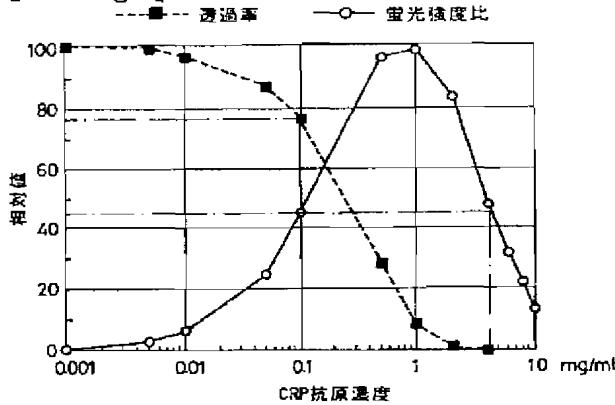
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

## DRAWINGS

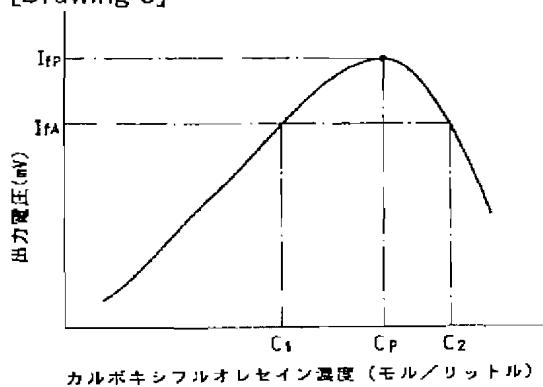
## [Drawing 1]



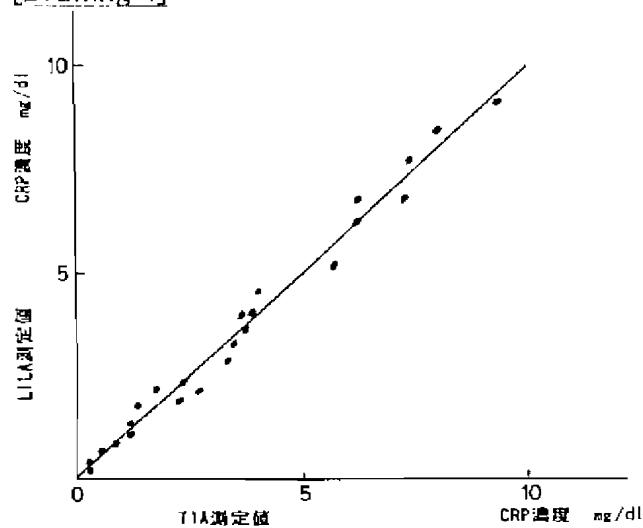
## [Drawing 2]



## [Drawing 3]



[Drawing 4]



---

[Translation done.]